

## Rozdelenie antokyanínov červených vín gradientovou HPLC

MILAN DRDÁK—PAVOL DAUČÍK—JOZEF KUBASKÝ—JOLANA KAROVIČOVÁ

**Súhrn.** Práca sa zaoberá optimalizáciou delenia antokyanínov HPLC v červených vínach za využitia butylaminu v mobilnej fáze pri gradientovej elúcii. Porovnávajú sa výsledky delenia antokyanínov v dvoch optimalizovaných systémoch s použitím a bez použitia butylaminu. Butylamin sa ukázal ako najvhodnejší z použitých alkylaminov. Optimalizovaná mobilná fáza sa skladá z  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{HClO}_4$ , butylaminu a redestilovanej vody. Optimalizácia gradientu sa robila experimentálne. Pri porovnaní oboch systémov sa ukázalo, že použitie butylaminu skráti čas analýzy, zlepši separačnú účinnosť a reprodukovateľnosť gradientu.

Cieľom kvapalinovej chromatografie je rozdeliť najmenej dve zložky v zmesi v prijateľnom čase tak, aby sa vymyli do detektora ako samostatné koncentračné zóny. Ideálne je, ak sú chromatografické píky symetrické, s gausovským rozdelením koncentrácie vymývanej zložky po dĺžke kolóny.

Za základné práce zaoberajúce sa analýzou flavonoidov a antokyanínových farbív metódou HPLC sa označujú publikácie Wulfa a Nagela [1, 2]. Antokyanínové farbivá v ušľachtilej odrode *Vitis vinifera* delili izokraticky za použitia mobilnej fázy: 10 % kyselina mravčia v 50 % roztoku metanol—voda. Zistili, že antokyaníny sa eluujú v poradí podľa svojej polarita. V svojej ďalšej práci [3] skúmali zmeny antokyanínov počas fermentácie a stárnutia vína odrody Merlot a Cabernet Sauvignon. Využili programovateľný gradient, pričom mobilnú fázu predstavoval roztok A: 10 % kyseliny mravej vo vode, a roztok B: 25 % acetónu v 10 % kyseline mravej.

Izokratickou elúciou sa zaoberali Wilkinson a kol. [4], pričom ako mobilnú fázu použili rozpúšťadlo voda—kyselina octová—metanol (71 : 10 : 19). Využitím izokratickej elúcie za použitia plánovaného experimentu (metóda ROCKP pre tri nezávislé premenné) a alky amínov v mobilnej fáze sa zaoberali Drdák

---

Doc. Ing. Milan Drdák, DrSc., Ing. Jozef Kubaský, Ing. Jolana Karovičová, CSc., Katedra sacharidov a konzervácie potravín; Ing. Pavol Daučík, CSc., Katedra technológie ropy a petrochémie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

a kol. [5]. Optimálne hodnoty faktorov zodpovedali zloženiu mobilnej fázy 35 %  $\text{CH}_3\text{OH}$  vo vode,  $0,16 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{HClO}_4$  a  $0,122 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  butylamínu.

Williams a Hrazdina [6] využili prednosti programovateľného gradientu. Na kolóne Bondapak C18 sa im podarilo za relatívne krátky čas odseparovať 20 antokyanínov. Van de Castele a kol. [7] využili programovaný gradient (pH rozpúšťadiel upravili  $\text{HCOOH}$ ) na kolóne Lichrosorb RP-18, identifikovali 10 antokyanínov, pričom analýza trvala 35 minút. Preston a Timberlake [8] analyzovali antokyaníny vo všetkých vyskytujúcich sa formách (chalkón, pseudobáza, flavýliový kation). V poslednom období bolo publikovaných niekoľko prác, ktoré sa zaoberajú analýzou antokyanínov v portských vínach (odporúčajú analýzu pri pH 1,5, pričom na úpravu pH používajú  $\text{HCOOH}$  alebo  $\text{HClO}_4$ ) [9—11].

Drdák a kol. [12—16] sa zaoberali podielom a zastúpením antokyanínov v červených vínach, ich zmenami počas fermentácie a zrenia mladých červených vín. Na základe optimalizovanej metódy delenia antokyanínov HPLC za využitia gradientovej elúcie sa taktiež zaoberali zastúpením antokyanínov v 9 odrodách modrých kultivarov hrozna.

## Materiál a metódy

Chemikálie: metanol pre UV spektroskopie (Lachema, Brno), kyselina chloristá — 70 % (Xenon, Lodž), butylamín (Lachema, Brno), trietylamin a dietylamín (VEB Labor. Chemie, Apolda), hexylamín a oktylamín (E. Merck), redestilovaná voda.

Vzorky: červené vína — Frankovka, Vavrinceké, Frankovka modrá, Svätovavrinceké, Alibernet, Cabernet Sauvignon, André, C-15 (novovyšlachtená odroda — kríženeц Svätovavrincekého, Frankovky modrej a Alibernetu).

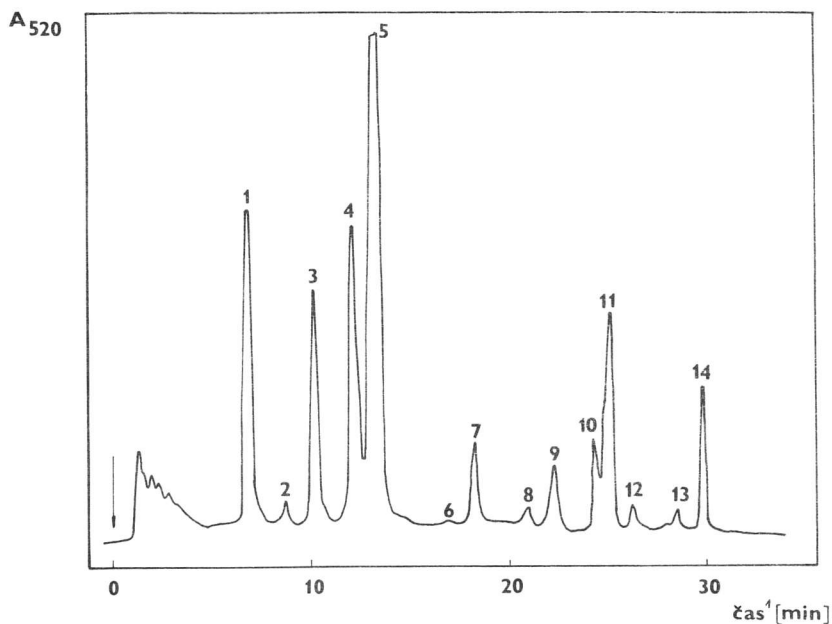
*Delenie antokyanínov HPLC.* Na delenie antokyanínových farbív červených vín sme použili vysokoúčinný kvapalinový chromatograf typu VARIAN 8500 (USA), vybavený spektrofotometrickým detektorom UV/VIS VARISCAN 634 D, zapisovačom A-25 a vysokotlakovým nástrekovým systémom stop flow.

Podmienky analýzy:

kolóna	SEPHARON-SGX ( $0,32 \times 15 \text{ cm}$ ),
prietok mobilnej fázy	$30 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ ,
pracovný tlak	14 MPa,
vlnová dĺžka detektora	520 nm,
citlivosť zapisovača	20 mV.

## Výsledky a diskusia

V našej predchádzajúcej práci sme určili optimálne zloženie mobilnej fázy pri izokraticej elúcii [5]. Preverili sme použitie viacerých alkylamínov (butylamín, dietylamín, trietylamín, hexylamín, oktylamín). Najlepšie výsledky poskytovala mobilná fáza s butylamínom, hoci počet oddelených antokyanínov (separačná účinnosť bola nižšia ako pri použití gradientovej elúcie) [12—15]. Na základe izokraticej elúcie s mobilnou fázou s butylamínom sme pre optimalizáciu gradientovej elúcie použili roztok A zloženia 10 obj. % metanolu  $\text{HClO}_4$   $0,16 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , butylamín  $0,122 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  a roztok B zloženia 90 obj. % metanolu,  $\text{HClO}_4$   $0,16 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , butylamín  $0,122 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Výsledné pH roztokov bolo 1,45. Pri optimalizácii sme použili víno Alibernet, ktoré má z analyzovaných vzoriek (Svätovavrinské, Frankovka modrá, Cabernet Sauvignon, André) najrovnomernejšie zastúpenie antokyanínov [12]. Gradient sme optimalizovali v dvoch krokoch, a to počiatočné zloženie mobilnej fázy a tvar a strmosť gradientu. Nakoľko zatiaľ ešte nie je optimalizácia gradientového vymývania spracovaná matematicky, tvorbu gradientu sme robili pokusne v rozmedzí 15 až 75 % B.



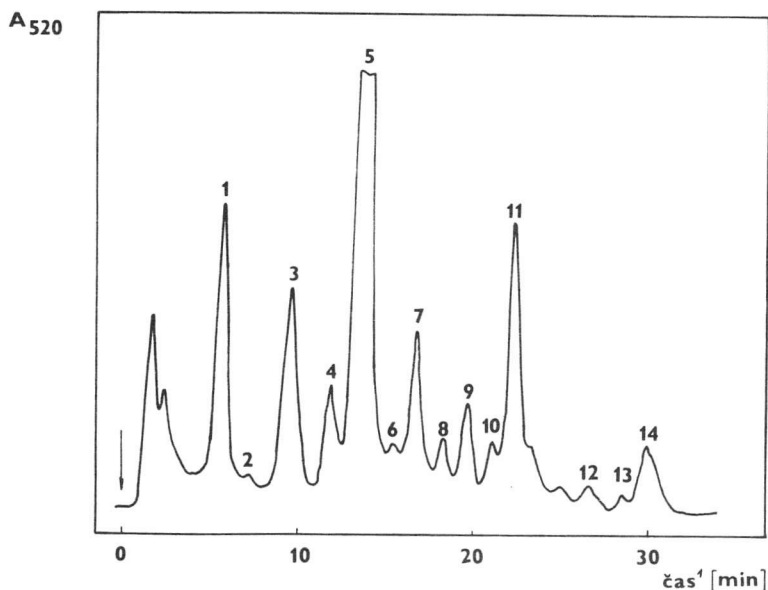
Obr. 1. Chromatografický záznam analýzy vzorky Alibernet gradientovou elúciou.

Fig. 1. Chromatogram of an analysis of the Alibernet wine sample using the gradient elution.  
(1 — Time.)

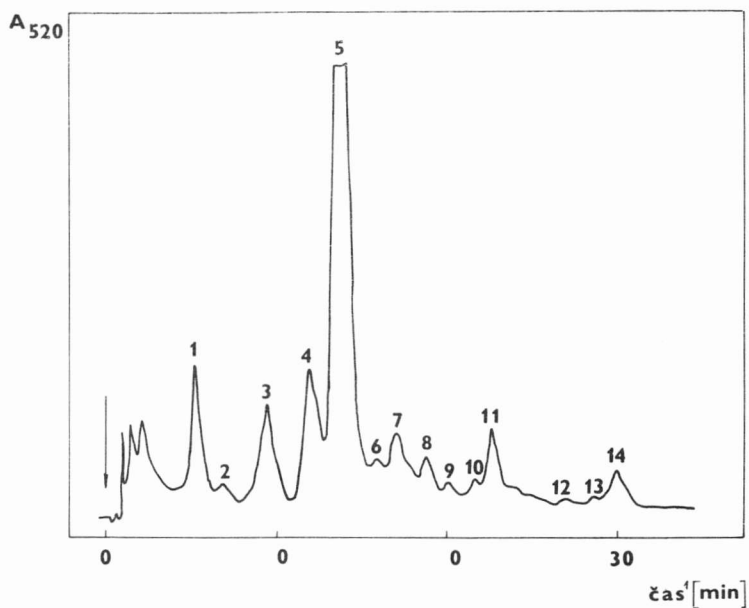
Na základe opakovaných analýz sa ako najvhodnejší ukázal tento typ gradientu: začiatok 25 % B, koniec 51 % B, 0 až 8 min 25 % B izokraticky, 8 až 12 min z 25 % na 41 % B ( $4\% \text{ B} \cdot \text{min}^{-1}$ ), 12 až 22 min zo 41 % na 51 % B ( $1\% \text{ B} \cdot \text{min}^{-1}$ ) 22 až 34 min 51 % B izokraticky.

Chromatografický záznam delenia antokyanových farbív vína Alibernet je na obr. 1, Svätovavríneckého vína na obr. 2, Frankovky na obr. 3 a vína Cabernet Sauvignon na obr. 4 za využitia tohto gradientu. V poradí píkov sme identifikovali tieto antokyaníny: delfidín-3-glukozid (1), kyanidín-3-glukozid (2), petunidín-3-glukozid (3), peonidín-3-glukozid (4), malvidín-3-glukozid (5), neidentifikovaný (6), delfidín-3-glukozidacetát (7), kyanidín-3-glukozidacetát (8), petunidín-3-glukozidacetát (9), peonidín-3-glukozidacetát (10), malvidín-3-glukozidacetát (11), delfidín-3-glukozid-*p*-kumarát (12), peonidín-3-glukozid-*p*-kumarát (13), malvidín-3-glukozid-*p*-kumarát (14).

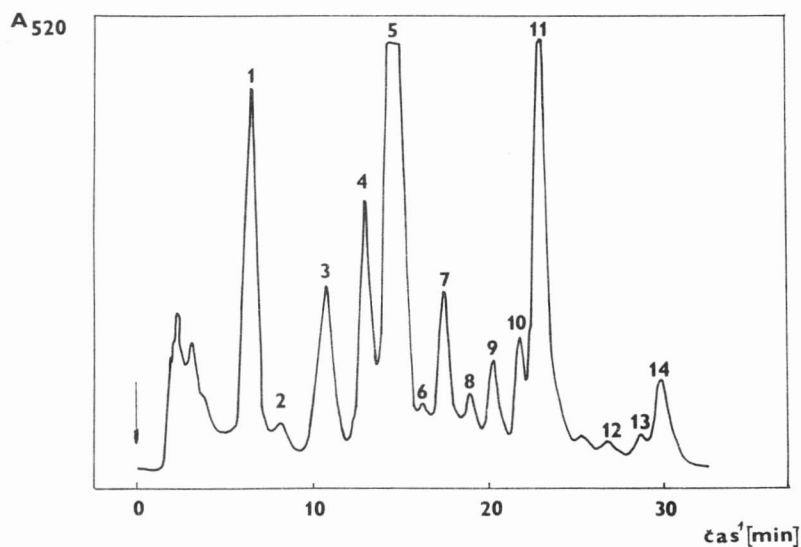
Výhodnosť vypracovanej metódy delenia antokyanínov HPLC je možno najlepšie dokumentovať porovnaním gradientu s butylamínom v mobilnej fáze s gradientom bez butylamínu. V práci [12] publikujeme optimálny gradientový program bez použitia butylamínu, ktorý je nasledovný: rozpúšťadlo A: 20 %  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 80 %,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,0251 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HClO}_4$  (pH 1,5); rozpúšťadlo B: 80 %  $\text{CH}_3\text{OH}$ , 20 %  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,0251 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HClO}_4$  (pH 1,5), začiatok 20 % B, koniec



Obr. 2. Chromatografický záznam vzorky Svätovavrínecké.  
Fig. 2. Chromatogram of the St. Laurence's wine sample. (1 — Time.)



Obr. 3. Chromatografický záznam vzorky Frankovka.  
Fig. 3. Chromatogram of the Frankovka wine sample. (1 — Time.)



Obr. 4. Chromatografický záznam vzorky Cabernet Sauvignon.  
Fig. 4. Chromatogram of the Cabernet Sauvignon wine sample. (1 — Time.)

75 % B, 0 až 20 min z 20 % na 40 % B (1 % B . min<sup>-1</sup>), 20 až 35 min z 40 % B na 70 % B (2 % B . min<sup>-1</sup>), 35 až 40 min zo 70 % B na 75 % B (1 % B . min<sup>-1</sup>).

Pri porovnaní uvedených gradientových programov sme sa zamerali na čas analýzy, separačnú účinnosť a reprodukovateľnosť gradientu.

*Čas analýzy.* Gradient s butylamínom trvá 6 minút kratšie ako bez butylamínu. Okrem toho pri gradiente s butylamínom boli píky na chromatogramoch rozložené omnoho rovnomernejšie.

*Separčná účinnosť.* Oba gradienty sme porovnali na základe selektivity ( $\alpha$ ), rozlišovacích faktorov ( $R_s$ ) oboch systémov a kapacitných faktorov ( $k'$ ). Pri výpočte kapacitných faktorov uvedených v tab. 1 sme počítali s mŕtvym elučným časom  $t_0 = 120$  s. Z tabuľky je zrejmé, že pri gradiente s butylamínom sme dosiahli lepšie podmienky a docielili lepšie rozlíšenie najmä pík 4, 5 a 10, 11.

Tabuľka 1. Porovnanie optimalizovaných gradientov z hľadiska selektivity  
Table 1. Comparison of optimized gradients according to the selectivity

Pík <sup>1</sup>	Gradient <sup>2</sup>					
	bez butylamínu <sup>3</sup>			s butylamínom <sup>4</sup>		
	$k'$	$\alpha$	$R_s$	$k'$	$\alpha$	$R_s$
1	3,37	1,33	16,33	1,71	1,43	17,29
2	4,48	1,20	11,26	2,45	1,39	17,41
3	5,37	1,22	12,78	3,40	1,35	17,05
4	6,57	1,10	6,37	4,58	1,24	13,18
5	7,22	1,41	21,35	5,67	1,19	11,06
6	—	—	—	6,73	1,10	6,61
7	10,18	1,14	9,14	7,42	1,11	6,83
8	11,61	1,08	5,26	8,20	1,08	5,55
9	12,49	1,10	6,79	8,88	1,09	5,97
10	13,73	1,02	1,82	9,67	1,05	3,68
11	14,07	1,05	3,58	10,18	1,14	9,26
12	14,77	1,05	3,57	11,63	1,06	4,35
13	15,50	1,04	2,60	12,35	1,07	5,09
14	16,06	1,05	3,57	13,25	1,05	3,52

1 — Peak, 2 — Gradient, 3 — without butylamine, 4 — with butylamine.

*Reprodukovateľnosť gradientu.* Pri porovnaní reprodukovateľnosti meraní sme vychádzali z opakovaných analýz 9 rôznych vzoriek odrodového vína Frankovka. Vypočítali sme priemerný kapacitný faktor ( $\bar{k}'$ ), smerodajnú odchýlku ( $s$ ) a rozptyl ( $\sigma$ ).

$R_s$  — rozlíšenie (rozlišovací) faktor

$$R_s = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{0,5(w_1 + w_2)} = \frac{t_R}{4\sigma},$$

kde  $t_{R_1}$ ,  $t_{R_2}$  je retenčný čas zložky 1 a 2,  $\sigma$  — rozptyl,  
 $w_1$ ,  $w_2$  — šírka píkovo 1 a 2.  
 $k'$  — kapacitný faktor

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0},$$

kde  $t_0$  je mŕtvy čas kolóny.  
 $\alpha$  — selektivita

$$\alpha_{1,2} = \frac{k'_2}{k'_1}.$$

$s$  — smerodajná odchýlka

$$s = \left[ \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \right]^{1/2}.$$

$\sigma$  — rozptyl

$$\sigma = \left[ \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n(n - 1)} \right]^{1/2}.$$

Tabuľka 2. Porovnanie optimalizovaných gradientov z hľadiska reprodukovateľnosti  
 Table 2. Comparison of optimized gradients according to the reproduction ability

Pík <sup>1</sup>	Gradient <sup>2</sup>					
	bez butylamínu <sup>3</sup>			s butylamínom <sup>4</sup>		
	$\bar{k}'$	$s$	$\sigma$	$\bar{k}'$	$s$	$\sigma$
1	4,00	0,92	0,86	1,99	0,16	0,15
2	5,25	0,93	0,87	2,77	0,26	0,23
3	6,35	1,09	1,02	4,04	0,34	0,31
4	7,68	1,15	1,08	5,25	0,34	0,31
5	8,49	1,19	1,12	6,10	0,21	0,19
6	10,89	1,31	1,23	7,12	0,19	0,18
7	11,82	1,01	0,95	7,78	0,18	0,17
8	12,75	0,86	0,80	8,61	0,21	0,19
9	13,25	0,81	0,75	9,28	0,20	0,18
10	13,96	0,73	0,69	10,05	0,19	0,17
11	15,12	0,63	0,59	10,56	0,19	0,17
12	15,71	0,54	0,50	11,89	0,19	0,16
13	16,44	0,65	0,60	12,79	0,20	0,18
14	16,81	0,56	0,52	13,70	0,26	0,24
15	17,56	0,50	0,47	14,33	0,25	0,23

For 1—4 see Table 1.

Porovnanie gradientov z hľadiska reprodukovateľnosti je v tab. 2. Z porovnaní týchto hodnôt je zrejmé, že reprodukovateľnosť meraní s gradientom za využitia butylamínu je omnoho vyššia a systém spĺňa vysoké kritériá kladené na delenie antokyanínov pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie.

### Záver

Ukázalo sa, že využitie alkylamínov, konkrétne osvedčeného butylamínu, ako polárnych rozpúšťadiel na zvýšenie elučnej sily, ovplyvnenie polarít stacionárnej fázy a zvýšenie rozpúšťacej schopnosti mobilnej fázy je pri delení antokyanínov gradientovou elúciou efektívne. Pri porovnaní doteraz publikovaných sústav na analýzu antokyanínových farbív červených vín sme došli k záveru, že náš optimalizovaný systém je zo všetkých stránok vhodnejší.

### Literatúra

1. WULF, L. W.—NAGEL, C. W., *J. Chromatogr.*, 116, 1976, s. 271.
2. WULF, L. W.—NAGEL, C. W., *Am. J. Enol. Vitic.*, 29, 1978, s. 42.
3. NAGEL, C. W.—WULF, L. W., *Am. J. Enol. Vitic.*, 30, 1979, s. 111.
4. WILKINSON, M.—SWEENEY, J. G.—IACOBUCCI, G. A., *J. Chromatogr.*, 132, 1977, s. 349.
5. DRDÁK, M.—DAUČÍK, P.—KUBASKÝ, J., *Bull. Potr. Výsk.*, 28, 1989, s. 189.
6. WILLIAMS, M.—HRAZDINA, G., *J. Chromatogr.*, 155, 1978, s. 389.
7. VAN DE CASTEELE, K.—GEIGER, M.—DELOOSE, R.—VAN SUMERE, Ch. F., *J. Chromatogr.*, 259, 1983, s. 291.
8. PRESTON, N. W.—TIMBERLAKE, F. C., *J. Chromatogr.*, 214, 1981, s. 222.
9. BAKKER, J.—TIMBERLAKE, C. F., *J. Sci. Food Agric.*, 36, 1985, s. 1325.
10. BAKKER, J.—PRESTON, N. W.—TIMBERLAKE, C. F., *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 1986, s. 121.
11. BAKKER, J., *Vitis*, 25, 1986, s. 203.
12. DRDÁK, M.—DAUČÍK, P., *Mitt. Klosterneuburg*, 39, 1989, s. 180.
13. DRDÁK, M.—DAUČÍK, P.—KUBASKÝ, J., *Mitt. Klosterneuburg*, 39, 1989, s. 224.
14. DRDÁK, M.—DAUČÍK, P.—KUBASKÝ, J., *Mitt. Klosterneuburg*, 39, 1989, s. 228.
15. DRDÁK, M.—DAUČÍK, P.—KUBASKÝ, J., *J. Chromatogr.*, 504, 1990, s. 207.
16. DRDÁK, M.—ALTAMIRANO, R. C.—RAJNIAKOVÁ, A.—ŠIMKO, P.—MALÍK, F.—BALÍK, J.—BENKOVSKÁ, D., *Mitt. Klosterneuburg*, 41, 1991, s. 190.

Do redakcie došlo: 29. 5. 1991



## **Разделение антоцианинов красных вин градиентовой высокоэффективной жидкостной хроматографией**

### **Резюме**

Работа занимается оптимизацией разделения антоцианинов высокоэффективной жидкостной хроматографией в красных винах при использовании бутиламина в подвижной фазе при применении градиентного элюирования. Сравниваются результаты разделения антоцианинов в двух оптимизированных системах при применении и без применения бутиламина. Оптимизированная мобильная фаза сложена из  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{HClO}_4$ , бутиламина и повторно дистиллированной воды. Оптимизация градиента делалась экспериментально. При сравнении обеих систем показалось, что использование бутиламина сократит время анализа, улучшит сепарационное действие и воспроизводимость градиента.

## **Separation of antocyanines from red wine sorts using the HPLC gradient**

### **Summary**

The paper deals with optimization of the separation of anthocyanines by HPLC in red wines using, butylamine in mobile phase in gradient elution. The results of separation obtained by two optimized systems, i.e. with butylamine and without butylamine are compared. Butylamine appears to be the most convenient among the used alkylamines. The optimized mobile phase consists of  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{HClO}_4$ , butylamine and redistilled water. The optimization was performed by experiment. The comparison of both systems with each other has shown that the use of butylamine reduces the time of analysis, improve the efficiency of separation and the reproducibility of gradient.